

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-269197

(43)Date of publication of application : 02.10.2001

---

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

G01N 31/22

G01N 33/53

G01N 33/566

G01N 35/02

---

(21)Application number : 2000-086645 (71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 27.03.2000 (72)Inventor : SEGAWA MASAYA  
TAKARADA YUTAKA

---

## (54) IMMOBILIZED OLIGONUCLEOTIDE PROBE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a technology for detecting a sequence-specific nucleic acid useful for a biological research and a clinical diagnosis.

SOLUTION: The method for detecting the sequence-specific nucleic acid and a reagent kit for detecting the nucleic acid are characterized by inserting a spacer having  $\leq 10$  nucleotides to a binding site of a hybridization region in a capture probe and a solid support when used as the capture probe by immobilizing oligonucleotide on the solid support.

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-269197

(P2001-269197A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001.10.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-リ-リ* (参考)
C 1 2 Q 1/08		C 1 2 Q 1/08	A 3 G 8 4 2
C 1 2 N 15/00	Z N A	G 0 1 N 31/22	1 2 1 P 2 G 8 5 8
G 0 1 N 31/22	1 2 1	33/53	M 4 B 8 2 4
33/53		33/556	4 B 8 6 3
33/586		35/02	F

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-86645 (P2000-86645)

(22) 出願日 平成12年3月27日 (2000.3.27)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 瀬川 昌也

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡

績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 室田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡

績株式会社総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固定化オリゴヌクレオチドプローブ

(57) 【要約】

【課題】 生物学的研究や臨床診断などに有用な、配列特異的な核酸検出技術を提供する。

【解決手段】 固体支持体にオリゴヌクレオチドを固定化して捕捉プローブとして使用する際に、捕捉プローブのハイブリダイズ領域と固体支持体結合部に10ヌクレオチド以下のスペーサーを介することを特徴とする配列特異的な核酸検出方法および核酸検出用試薬キット。

(2)

特開2001-269197

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブが固定化されてなる固体支持体であって、該プローブが検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10～50塩基のヌクレオチド配列により構成されるハイブリダイズする領域及び検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を含んで成り、該スパーサー領域は一端において前記固体支持体に結合し他端において前記ハイブリダイズする領域に結合してなり、かつ該スパーサー領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする固体支持体。

【請求項2】 前記スパーサー領域が4～10塩基のオリゴヌクレオチドからなる請求項1記載の固体支持体。

【請求項3】 前記固体支持体がマイクロタイプレートである請求項1又は2に記載の固体支持体。

【請求項4】 前記プローブがオリゴデオキシリボヌクレオチド又はその誘導体である請求項1～3のいずれかに記載の固体支持体。

【請求項5】 検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10～50塩基のヌクレオチド配列により構成されるハイブリダイズする領域を含んでなる反応性基を有する少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブを、検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を介して固体支持体に固定化する方法であって、該スパーサー領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする方法。

【請求項6】 前記固体支持体としてポリカルボジイミドがコートされたマイクロタイプレートを用い、カルボジイミド基の付加反応により前記プローブの末端と結合せしめる請求項5記載の方法。

【請求項7】 請求項1～4のいずれかに記載の固体支持体を含んで成ることを特徴とする核酸検出用試薬キット。

【請求項8】 特異的に結合した標的核酸の検出手段を含む請求項7記載の核酸検出用試薬キット。

【請求項9】 以下の工程(a)および(b)を含んでなるサンプル中の核酸配列の存在を検出する方法。

(a) 該サンプルを相補的核酸配列のハイブリダイゼーションを許容する条件下で請求項1～4のいずれかに記載の固体支持体と接触せしめる

(b) ハイブリダイゼーションが起ったか否かを決定する

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、核酸化学及び特定の核酸配列の検出に関する。さらに詳しくは、本発明は、核酸プローブを固定化する方法、固定化されたプローブを含んで成る安定な測定試薬、及びこれらの固定化

2

されたプローブを用いて行われるハイブリダイゼーションアッセイに関する。本発明は、臨床診断、法医学、微生物の環境調査、食料及び薬品の品質保証、並びに分子生物学の研究手法において有用なものである。

【0002】

【従来の技術】 ハイブリダイゼーションアッセイは、ある特定の配列に相補的な標的核酸(以下、プローブともいう)を用いてハイブリダイゼーションによりその配列を検出するものである。ハイブリダイゼーションアッセイは研究分野では古典的な技術(Current protocols in molecular biology(John Wiley&Sons, Inc.), Molecular Cloning 2nd Ed.(Cold Spring Harbor Press))であるが、これらの文献に記載されている方法は、検出すべき核酸を含む試料をニトロセルロースメンブレン等に固定化して溶液中の核酸プローブを反応させる。Falkowらは、米国特許第4,358,535号において、感染症診断のための特異的DNAプローブの使用を記載しているが、これも試料(例えば、血液、細胞、唾液等)をメンブレンフィルター(例えば、ニトロセルロース)上にスポットし、細胞を溶解し、そして核酸を化学変性及び加熱により固定する工程を含んで成る。しかしながら、核酸試料を固定化する操作は面倒であり、多数の試料を検査する臨床診断などには不向きであった。

【0003】 Rankinらは、逆に核酸プローブを固定化することによりこの問題を解決している(Gene, 21:77-85, 1983)。固定化した配列特異的核酸プローブでハイブリダイゼーションにより試料中の標的配列を捕捉し、そして捕捉された標的配列を別のラベルされた配列特異的核酸プローブで検出する。いわゆるサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ(特開昭58-40099号公報)である。この方法により、ハイブリダイゼーション反応のみでアッセイが完了し、操作は単純化するので自動化もしやすくなる。さらに、Gingerasらは、比較的短いオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブとして用いることにより反応時間を短縮できることを報告している(Nucleic Acids Research, 15:5373-5390, 1987)。

【0004】 上記のような手法では、核酸プローブをいかに安定的に固体支持体に結合させるかが問題となる。この結合様式は、疎水結合などの非共有結合を用いる方法(特開平5-271272号公報)及び共有結合を用いる方法とに大別される。共有結合を用いる方法では、固体支持体にアミノ基を導入し、核酸プローブの末端にリン酸基を生成させて結合させる方法(Analytical Biochemistry, 198:138-142, 1991)や、ポリカルボジイミド樹脂を塗布し、カルボジイミド基を介して核酸に導入したアミノ基や核酸が本来持っているイミノ基と結合させる方法(特開平8-23975号公報)などがある。一般に、共有結合を用いる方がより安定した結果と製品の保存性をもたらすことから実用上有利である。

(3)

特開2001-269197

3

【0005】本発明者らは、オリゴヌクレオチドにアミノ基を導入し、この特開平8-23975号公報に記載される方法を用いてポリカルボジイミドをコートしたポリスチレン製マイクロタイタープレートに結合させて検定プローブとする方法を開発してきた。しかしながら、この方法においては、ハイブリダイゼーションの効率が高いという問題があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ハイブリダイゼーションの効率の面で優れた核酸ハイブリダイゼーションによる核酸の検出系を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意検討した結果、固体支持体に結合することによる立体障害がハイブリダイゼーションの効率を低下させていることを見出した。そして、結合部分とプローブのハイブリダイゼーション可能領域をスパーサー領域により離すことによりハイブリダイゼーションの効率を促進させることが可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブが固定化されてなる固体支持体であって、該プローブが検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜50塩基のヌクレオチド配列により構成されるハイブリダイズする領域及び検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を含んで成り、該スパーサー領域は一様において前記固体支持体に結合し他端において前記ハイブリダイズする領域に結合しており、かつ該スパーサー領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする固体支持体。

(2) 前記スパーサー領域が4〜10塩基のオリゴヌクレオチドからなる(1)の固体支持体。

(3) 前記固体支持体がマイクロタイタープレートである(1)又は(2)の固体支持体。

(4) 前記プローブがオリゴデオキシリボヌクレオチド又はその誘導体である(1)〜(3)のいずれかの固体支持体。

(5) 検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜50塩基のヌクレオチド配列により構成されるハイブリダイズする領域を含んでなる反応性を有する少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブを、検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を介して固体支持体に固定化する方法であって、該スパーサー領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする方法。

(6) 前記固体支持体としてポリカルボジイミドがコー

4

トされたマイクロタイタープレートを用い、カルボジイミド基の付加反応により前記プローブの末端と結合せしめる(5)の方法。

(7) (1)〜(4)のいずれかの固体支持体を含んで成ることを特徴とする核酸検出用試薬キット。

(8) 特異的に結合した核酸の検出手段を含む

(7)の核酸検出用試薬キット。

(9) 以下の工程(a)および(b)を含んでなるサンプル中の核酸配列の存在を検出する方法。

(a) 該サンプルを相補的核酸配列のハイブリダイゼーションを許容する条件下で(1)〜(4)のいずれかの固体支持体と接触せしめる

(b) ハイブリダイゼーションが起ったか否かを決定する

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の理解及び記載を助けるため、次の用語を以下のように定義する。「標識」とは「ラベル」とは、検出可能な、好ましくは定量可能なシグナルを提供するために使用することができ、そして核酸又は蛋白質に結合させることができる任意の原子又は分子を意味する。上記ラベルは、蛍光、発光、吸光、放射能、磁気、質量、酵素活性等により検出することができるシグナルを提供する。適当なラベルとしては蛍光物質、発色物質、放射性原子（特に $^{32}\text{P}$ 又は $^{33}\text{P}$ ）、電子密度試薬、酵素、及び特異的結合パートナーを有するリガンドが含まれる。

【0009】酵素を用いる場合は、典型的にはその活性により検出される。例えば、ペルオキシダーゼ(以下、HRPとも示す)はジアミンベンジジンなどを分光光度計によって定量できる青色色素に変換するその能力によって検出することができる。同一のラベルが複数の異なる態様で機能することができるので、上記の記載は複数のラベルを別個のクラスに分類することを意味するものではない。例えば、 $^{32}\text{P}$ は放射性ラベルとして又は電子密度剤として機能することができる。HRPは酵素として、又は抗体例えばモノクローナル抗体(MAb)に対する抗原として機能することができる。さらに、所望の結果のために複数のラベルを組み合わせてすることができる。例えば、MAb及びアビジンをラベルして本発明の実施のために用いることができる。プローブをビオチンによりラベルし、そしてその存在を $^{32}\text{P}$ によりラベルされたアビジンにより検出し、さらにHRPでラベルされた抗ビオチンMAbにより検出することができる。あるいは、ssDNA(又はハイブリダイズしたRNA)に対するラベルされたMAbを用い、そして核酸をラベルすることなくハイブリダイゼーションの存在を直接検出することができる。それ以外の態様についても可能であり、上記の態様に限定されるものではない。

【0010】「オリゴヌクレオチド」とは、2個以上のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドから成

を分子である。オリゴスクレオチドはまたスクレオチド類似体、例えばホスホロチネート及びアルキルホスホネート、並びに誘導体化された(すなわち、ラベルされた)オリゴスクレオチドを含むことができる。人工的に合成したオリゴスクレオチドはプライマー、プローブ、検出対照及び未ラベルのブロックングオリゴマーなどに使用し、オリゴスクレオチドのサイズは最終的な検読又は用途に依存する。

【００１１】「プローブ」とは、目的物を検出あるいは定量するための構造や分子である。当該分野では、検出対象の核酸配列とハイブリダイズによって特異的に結合する標識あるいは固定化された核酸分子、すなわち「核酸プローブ」を指すことが多い。本発明においても、単に「プローブ」と表現している場合も全て「核酸プローブ」を指している。核酸プローブには、天然の核酸分子を標識あるいは固定化したものと人工的に合成した核酸分子（オリゴヌクレオチド）を標識あるいは固定化したものがある。該核酸分子は、好ましくは単鎖であるが、二本鎖であってもよい。二本鎖である場合には、通常はハイブリダイズに使用する前にその鎖を分離するために処理したものを用いる。本発明においては、人工的に合成したオリゴヌクレオチドをプローブに使用している。プローブはハイブリダイズするために十分に長くなければならないが、長すぎると逆に非特異的反応を誘発するので好ましくない。したがって、適当な長さはハイブリダイゼーション反応条件など多くの因子に依存して決定される。

【0012】「配列特異的ハイブリダイゼーション」は、ハイブリダイゼーションが起こるためにプローブとサンプル標的配列との間の正確な相補性が要求される厳格なハイブリダイゼーション条件であることを意味する。この条件は当業者により容易に認識され、そしてプローブの長さ(鎖長)及び塩基組成に依存する。一般に、正確な一致が存在しない場合にプローブが実質的にハイブリダイズしない条件を得るためには、ハイブリダイゼーション溶液の温度、pH、イオン強度、及びカオトロピック剤(chotropic agent)の濃度などのハイブリダイゼーション条件を変えるか、プローブの位置や鎖長そのものを変更する。結合したDNAへのプローブのハイブリダイゼーションのため、標準的条件(0.9M NaCl)下で最適温度を決定するための実験式として、 $T_m(^{\circ}\text{C}) = 4 \times (\text{NG} + \text{NC}) + 2 \times (\text{NA} + \text{NT}) - 5$

が知られている。ここでNG、NC、NA及びNTは、それぞれプローブ中のG（グアニン）、C（シトリン）、A（アデニン）及びT（チミン）塩基の数である(J. Meinkothら、1984, *Analyt. Biochem.*, 138:267-284)。もっとも、当業者はこの数式は単に最適温度についておよその値を与えるに過ぎず、真の最適温度を得るためには実験的に検証されるべきであることを認識している。最適

度が $2 \times 3$  S.C程度、温度が $50^\circ\text{C}$ 程度のハイブリダイゼーション条件では、1塩基の相違でも識別できる核酸プローブとして用いる場合、銀塩 $20 \sim 30$ ヌクレオチドの鎖長を有していることが好ましい。

【0013】本発明は、検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜50塩基のヌクレオチド配列により構成されるハイブリダイズする領域を含んでなる反応性基を有する少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブを、検出されるべき特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を介して固体支持体に固定化する方法である。本発明においては、該スパーサー領域を構成するオリゴヌクレオチドは10塩基以下であることを特徴とする。好ましくは4〜10塩基、さらに好ましくは4〜6塩基である。

【0014】固定化プローブにスパーサーを導入する方法は、特許第289795号公報にも既に記載されている、しかしながら、ここに記載されている方法では200〜800塩基、少なくとも150塩基以上のきわめて長いオリゴヌクレオチドからなるスパーサー領域を必要としている。数百塩基からなる核酸を化学合成するのはコストが莫大となるだけでなく、収量や純度も著しく低下する。そのため、合成後に連結させるなどの工夫がなされているが、製造工程が複雑になる。これに対し、本発明の方法ではスパーサーはわずか10塩基以内で十分である。この程度ならばプローブ用オリゴヌクレオチドの化学合成の際に付加しても大したコスト増にはならず、プローブの製造工程はスパーサーがない場合とあまり変わらない。すなわち、合成の際にハイブリダイズする領域の前あるいは後にスパーサーの配列を付加するのみである。検討の結果、スパーサーの付加によってハイブリダイゼーションの効率性は明らかに向上するが、多くの場合4〜10塩基で効率はほぼ同じであった。よって、本発明のスパーサーは10塩基で十分と考えられる。本発明におけるスパーサーの配列についても検討している。その結果、ハイブリダイズする領域に全く影響がない配列であれば、どのような配列でも問題がないことが判明した。実際の運用においては、特に問題がない限りオリゴヌクレオチド合成試薬のコストなどの理由によりpolyT配列をスパーサーとして採用している。

【0115】本発明における固体支持体との結合様式についても検討している。本発明者らは、疎水結合などの非共有結合による方法でも同様の効果を確認している。例えば、アルカリ性の緩衝液(pH10程度)を用いて、アミノリンカーを有するオリゴヌクレオチドを高吸着性のマイクロタイタープレートに疎水結合で固定化することができるが、この場合も、末端のリンカー部とハイブリダイズ領域の間にスパーサー領域を付加することにより、ハイブリダイゼーションの効率を明らかに向上した。やはりヌクレオチドで効果はほぼ最大に達しており、共有結合の場合と同じ傾向を示した。固体支持体と

(9)

特開2001-269197

7

の結合部分が明確であるならば、本発明の効果は結合の様式に関わらず発揮されるものである。

【0016】さらに本発明は、少なくとも1種のオリゴヌクレオチドブローブ（以下、単にブローブともいう）が固定化されてなる固体支持体であって、該ブローブが検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜50塩基のヌクレオチド配列により構成されるハイブリダイズする領域及び検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスペーサー領域を含んで成り、該スペーサー領域は一端において前記固体支持体に結合し他端において前記ハイブリダイズする領域に結合してなり、かつ該スペーサー領域が10塩基以下、好ましくは4〜10塩基、さらに好ましくは4〜8塩基のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする固体支持体である。

【0017】さらに本発明は、上記固体支持体を含むことを特徴とする核酸検出用試薬キット、特にスペーサーアームを介して共有結合したオリゴヌクレオチドを有する固体支持体を含む安定な核酸検出用試薬キットに関する。さらに特異的に結合した標的核酸の検出手段を含むことが好ましい。上記特異的に結合した標的核酸の検出手段とは、例えばラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、酵素など、標的核酸に直接あるいは間接結合した標識、あるいは標識されたオリゴヌクレオチドからなる検出ブローブをいうものである。標識の結合様式としては、標的核酸上の固体支持体に固定化したブローブ（捕捉ブローブ）とは別の領域にハイブリダイズするブローブを標識する方法（いわゆるサンドイッチハイブリダイゼーション）や、核酸増幅の際に標識プライマーや標識モノヌクレオチドを取り込ませて標的核酸を直接標識する方法などがある。また、抗体と抗原、ヒオチンとアビジンなどの結合を介してハイブリダイゼーション後に標識する方法もある。該核酸検出用試薬キットは臨床診断、法医学、微生物の環境調査、食料及び薬品の品質保証、並びに分子生物学の研究手法等に広く応用される。

【0018】本発明は固体支持体に結合した捕捉ブローブの形態に関するものであり、検出手法は特に制限されない。また、固体支持体に結合した捕捉ブローブにハイブリダイズする標的核酸が直接標識されていてもよい（特開昭62-265999号公報）。また、前記サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイのように、捕捉ブローブに結合した標的核酸を検出するための標識された検出ブローブを用いてもよい（特開昭58-40099号公報）。該標識としては、放射性同位体、蛍光物質、電子密度試薬、酵素等が挙げられ、アビジン/ヒオチン結合や抗体等あるいはインターカレーター等を用いた間接標識でもよいことはいふまでもない。

【0019】また、固体支持体の材質、形状等についても特に制限されるものではないが、アッセイの容易さの

8

点からはマイクロタイタープレートを用いるのが好ましい。該マイクロタイタープレートの材質は特に限定されないが、好ましくはポリスチレン製である。また、該マイクロタイタープレートの形状としては最も一般的な96穴のプレートが挙げられるが、その1列分もしくは1行分に相当する8穴もしくは12穴を有してなるストリップ状のものも含まれる。さらに、専用装置の開発に伴い、固体支持体がそれに応じた材質であっても、あるいは特殊な形状を有していても本質的に何の問題もない。例えば、ガラス製もしくはプラスチック製の板状の固体支持体を用いて、異なる複数のブローブを固相化するための個別の領域を有する寸法安定性固体支持体（いわゆるDNAチップ）への応用は容易に類推できるところである。これらへの使用が物理的方式を改良し、そしてハイブリダイゼーション及び検出の信頼性、経済性を増進せしめる。

【0020】本発明の重要な観点は、固体支持体に結合させるオリゴヌクレオチドブローブの構造に関して、大衆生産に特に適しており、そして最大のブローブの持続及びハイブリダイゼーション効率を可能にする方法を提供したことにある。本発明は共有結合による結合の永続性のため、固定化されたブローブの調製とそれらの使用とを時間的に分けることができ、必要に応じて試験サンプル中の標的核酸配列を迅速に検出するために使用することができる貯蔵安定性検出試薬、すなわちハイブリダイゼーション捕捉固体支持体の調製が可能となる。固体支持体とブローブとの間にスペーサー領域を介することにより、ハイブリダイゼーションの効率は大幅に促進されそして改良される。

【0021】

【実施例】以下に、本発明の実施例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとする。なお、実施例により本発明が特に限定されるものではない。

【0022】実施例1 アミノリンカーオリゴヌクレオチドの合成と固定化

アミノリンカーアームを有するオリゴヌクレオチドを合成し、ポリカルボジイミドをコートしたポリスチレン製マイクロタイタープレート内面に結合させて捕捉ブローブとした。この際、本発明のスペーサー領域を導入して比較検討の試料とした。

【0023】(1) アミノリンカーアームを有する捕捉ブローブ用オリゴヌクレオチドの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列表・配列番号1に示される配列を有するオリゴヌクレオチド（ヒト型結核菌マイコバクテリウム・ツベルクルシス（*Mycobacterium tuberculosis*）16S rRNA遺伝子検出用捕捉ブローブ（以下、捕捉ブローブと呼ぶ）用オリゴヌクレオチド）を合成した。この際、特表昭60-500717

(6)

特開2001-269197

9

10

号公報に記載される合成法によりデオキシウリジンから化学合成により調製した。5位にアミノリンカーアームを有するウリジンを、上記オリゴヌクレオチドに導入した。このウリジンはオリゴヌクレオチド内の任意のT残基を置換しうるが、ここでは5'末端に付加し、更にスベ \*

スターとしてT残基を以下に示すように、各0、4、5、10、15塩基付加したものを合成した。

【0024】

【化1】

5'-X ACATGCATCC CGTGGTCTTA-3'

スベスター：なし

5'-X TTTT ACATGCATCC CGTGGTCTTA-3'

スベスター：4塩基

5'-X TTTTT ACATGCATCC CGTGGTCTTA-3'

スベスター：5塩基

5'-X TTTTTTTTTT ACATGCATCC CGTGGTCTTA-3'

スベスター：10塩基

5'-X TTTTTTTTTTTTTT ACATGCATCC CGTGGTCTTA-3'

スベスター：15塩基

(X:アミノリンカーアームを有するウリジン)

【0025】合成されたリンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で50℃、一夜脱保護処理を施した後、ファルマシア社製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。

【0026】(2) ポリカルボジイミドコートプレート内面への結合

ポリカルボジイミドをコートしたポリスチレン製マイクロタイプレート(NSプレートDN; 日清紡績株式会社製)内面に、(1)で合成した各種アミノリンカーオリゴヌクレオチドをそれぞれ結合させた(特開平8-23975号公報)。固体支持体のカルボジイミド基とオリゴヌクレオチドのアミノ基が反応し、共有結合する。まず2M NaCl溶液中にアミノリンカーオリゴヌクレオチドを5mMの濃度で加え、200μlずつNSプレートDNに分注した。そのまま37℃で1時間保温し、蒸留水で洗浄した。得られた捕捉プローブ結合プレートは、真空乾燥させ乾燥状態で冷蔵保存した。

【0027】実施例2 直接標識核酸検出における本発明捕捉プローブの性能評価

捕捉プローブに鎖延伸的酵素標識オリゴヌクレオチドを合成し、これを標的として検出することにより、本発明捕捉プローブの性能を評価した。

【0028】(1) アミノリンカーアームを有するオリゴヌクレオチドの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列表・配列番号2に示される配列のオリゴヌクレオチド(捕捉プローブ標的オリゴヌクレオチド)を合成した。この際、特表昭60-500717号公報に記載される合成法によりデオキシウリジンから化学合成により調製した、5位にアミノリンカーアームを有するウリジンを、上記オリゴヌクレオチドに導入した。このアミノリンカーアームを有するウリジンはオリゴヌクレオチド内の任意のT残基を置換しうるが、ここでは5'末端のT残基と置換した。合成されたリンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で50℃、一夜脱保護処理を施した後、ファルマシア社

FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。

【0029】(2) 酵素(アルカリ性ホスファターゼ)によるオリゴヌクレオチドの標識

上記(1)で合成した捕捉プローブ標的オリゴヌクレオチドについて、そのアミノリンカーアームを介してのアルカリ性ホスファターゼ(以下、ALPともいう)との結合を、文献(Nucleic Acids Res.; 第14巻、第6115頁、1986年)に従って行った。リンカーオリゴヌクレオチド(OD260=1.5)を0.2M NaHCO<sub>3</sub> 12.5μlに溶解し、ここへ10mg/ml スペリン酸ジスチニミジル(DSS)25μlを加えて室温で2分間反応させた。反応液を1mM CH<sub>3</sub>COONa (pH5.0)で希釈化したSephadex G-25(ファルマシア社製)カラム(1cmφ×30cm)でゲル濾過して過剰のDSSを除去した。末端のアミノ基が活性化されたリンカーオリゴヌクレオチドを、更にモル比で2倍量のアルカリ性ホスファターゼ(ペーリンガー・マンハイム製)を100mM NaHCO<sub>3</sub> 3M NaClに溶解したもの)と室温で16時間反応させることでアルカリ性ホスファターゼを標識オリゴヌクレオチドを得た。得られた標識オリゴヌクレオチドは、ファルマシア社製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。標識オリゴヌクレオチドを含む画分を集め、セントリコン30K(アミコン社製)を用いて限外濾過法により濃縮した。これを捕捉プローブ標的オリゴヌクレオチドとして用いる。

【0030】(3) マイクロタイプレート中でのハイブリダイゼーション

上記(2)のALP標識した捕捉プローブ標的オリゴヌクレオチドを各1.0、1.0mg/μlの濃度で含む、あるいはこれを加えない5×SSC(pH7.0)、0.1%スクラフAG(日本精化株式会社製)、0.5%PVP、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM 2nCl<sub>2</sub>、0.1%Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>の溶液100μlを各種捕捉プローブ結合プレートに注入し、蒸発を防ぐため流動パラフィンを重畳して50℃で30分振盪させた(それぞれ、100、10、0f mol/assay)。その後、2×SSC(pH7.0)、0.1

11

% スクラフ AG に置換し、50℃で10分保温。さらに1×SSCに置換して洗浄した。洗浄液を排出後、ALPの発光基質であるLumiphos 430(Lumigen製)100μlを注入し、37℃で15分保温後に暗室中でホトンカウンター(浜松ホトニクス社製)で発光量(発光シグナル)を測定した。これらの工程は全てDNAプローブ自動測定システム(日本臨床検査自動化学会誌;第20巻、第728頁、1995年)により自動で行われ、所要時間は約1時間である。上記発光シグナルの強さがハイブリダイゼーション反応の強さを示している。

【0031】(4) 結果

捕獲プローブのスペーサーがない(0塩基)場合に比べ、\*

低発光量を示す。

濃度 fmol/assay	0	4	5	10	15
100	48,791	117,840	124,280	118,150	117,493
10	4,188	11,418	12,014	12,416	11,524
blank	48	82	88	44	45

単位: cps(count/second)

測定結果: 3 重复測定の平均

【0033】実施例3 サンドイッチハイブリダイゼーションにおける本発明捕獲プローブの性能評価  
捕獲プローブ及び標識プローブに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをサンドイッチハイブリダイゼーションの標的として検出することにより本発明捕獲プローブの性能を評価した。

【0034】(1) オリゴヌクレオチドの合成  
パーキンエルマー社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列表・配列番号3に示される配列を有するオリゴヌクレオチド(ヒト型結核菌16S rRNA遺伝子検出用標識プローブ(以下、標識プローブと呼ぶ)用オリゴヌクレオチド)及び配列表・配列番号4に示される配列を有するオリゴヌクレオチド(サンドイッチハイブリダイゼーション標的オリゴヌクレオチド(以下、標的オリゴヌクレオチドと呼ぶ))を合成した。標識プローブ用オリゴヌクレオチドを合成する際、特許第60-560717号公報に開示された合成法によりデオキシウリジンから化学合成により調製した、5'位にアミノリンカーアームを有するウリジンを、配列表・配列番号3に記載のオリゴヌクレオチドに導入した。このウリジンはオリゴヌクレオチド内の任意のT残基を置換しうるが、ここでは5'末端から11番目のT残基を置換した。合成されたオリゴヌクレオチドは、いずれもアンモニア水で、50℃、一夜脱保護処理を施した後、ファルマシア製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。

【0035】(2) アルカリ性ホスファターゼによるオリゴヌクレオチドの標識

上記(1)で合成した標識プローブ用オリゴヌクレオチドについて、そのアミノリンカーアームを介したALP

(7)

特開2001-269197

12

\* 4塩基以上ある場合は2倍以上の発光シグナルを示している。100 fmol/assay、10 fmol/assayのどちらも同じような比率で向上していることから、結合している捕獲プローブの電量(キャパシター)などが変化しただけではなく、スペーサーの付加によってハイブリダイゼーション効率自体が向上したものと考えられる。また4塩基から15塩基までではあまり変化がないことから、本検出系においてはスペーサーは4塩基で十分ということになる。本結果により、本発明のスペーサーの効果は実証された。

【0032】

【表1】

との結合を、文献(MacLennan Acids Research;第14巻、第6115頁、1985年)の記載に従って行った。リンカーオリゴヌクレオチド(OD260=1.5)を0.2M NaHCO<sub>3</sub> 12.5 μlに溶解し、ここへ10mg/ml スペリン酸ジスルホニル(DSS)2.5 μlを加えて室温で2分間反応させた。反応液を1mM CH<sub>3</sub>COONa (pH5.0)で平衡化したSephadex G-25(ファルマシア製)カラム(1cmφ×30cm)でゲル濾過して過剰のDSSを除去した。末端のアミノ基が活性化されたリンカーオリゴヌクレオチドを、更にモル比で2倍量のアルカリ性ホスファターゼ(パーリナーマンハイム製)を100mM NaHCO<sub>3</sub>、3M NaClに溶解したもの)と室温で10時間反応させることでALP標識オリゴヌクレオチドを得た。得られた標識オリゴヌクレオチドは、ファルマシア製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。標識オリゴヌクレオチドを含む画分を集め、セントリコン30K(アミコン製)を用いて膜外濾過法により濃縮した。これをサンドイッチハイブリダイゼーションの標識プローブとして用いる。

【0036】(3) マイクロタイタープレート中でのサンドイッチハイブリダイゼーション

標的オリゴヌクレオチドを各10、1 fmol/μlの濃度で含む水溶液あるいは単なる純水(ブランク用)を等量の0.8N NaOHと混合して変性させ、各検査ごとに30 μlを200mM クエン酸-リン酸緩衝液(pH6.0)、2%スクラフ AG(日本精化株式会社製)、750mM NaCl、0.1% NaN<sub>3</sub>の溶液(80 μl)と混合して速やかに実施例1の捕獲プレート内に注入し、蒸発を防ぐため流動パラフィンを重層して50℃で30分保温させた(それぞれ、100、10、0 fmol/assay)。こ



13

の反応によって標的オリゴヌクレオチドは捕捉プローブに捕捉される。

【0037】次に、上記(2)の捕捉プローブを10 fmol/ $\mu$ lの濃度で含む5×SSC(pH 7.0)、0.1%スクラップAG、0.5% PVP、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ZnCl<sub>2</sub>、0.1% Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>の溶液100  $\mu$ lと置換し、同様に蒸発を防ぐため流動パラフィンを塗布して、50℃で30分標置させた。これによって、捕捉された標的オリゴヌクレオチドに捕捉プローブが特異的に結合する。その後、2×SSC(pH 7.0)、0.1%スクラップAGに置換し、50℃で10分標置。さらに1×SSCに置換し洗浄した。洗浄液排出後、ALPの発光基質であるLumiPhos 460(Lumigen製)100  $\mu$ lを注入し、37℃で15分標置後に暗室中でホトンカウンター(浜松ホトニクス製)で発光量(発光シグナル)を測定した。これらの工程はすべて、DNAプローブ自動測定システム(日本臨床検査自動化学会誌;第20巻、第728頁、1995年)により自動で行われ、所要時間は約2時間である。上記発光シグナルの強さ

(8)

特開2001-269197

14

\*さがハイブリダイゼーション反応の強さを示している。

【0038】(4)結果

捕捉プローブのスペーサーがない(0塩基)場合に比べ、4塩基以上ある場合はおよそ3倍の発光シグナルを示している。直接標識核酸の場合と同様、100 fmol/assay、10 fmol/assayのどちらも同じような比率で向上していることから、結合している捕捉プローブの総量(キャパシティ)などが変化したのではなく、スペーサーの付加によってハイブリダイゼーション効率そのものが向上したと考えられる。また、4塩基から15塩基まであまり変化がないことから、本検出系においてはスペーサーの長さは4塩基あれば十分ということになる。実施例2の直接標識核酸における検出の場合と同様に非常に鋭いピークを示していることから、捕捉プローブによる捕捉工程のハイブリダイゼーション効率が向上したことが強く示唆される。本結果により、本発明のスペーサーの効果は実証された。

【0039】

【表2】

サンディッチハイブリダイゼーション

検量 fmol/assay	捕捉プローブのスペーサー長(塩基)				
	0	4	5	10	15
100	17,342	52,185	51,945	52,181	49,210
10	1,810	4,976	5,580	5,105	6,024
Blank	71	65	56	69	79

単位: cps(count/second)

測定結果: 3重測定平均

【0040】

【発明の効果】上述したように、本発明においては、10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなるスペーサーを用いてプローブを固体支持体に固定化することにより、極めて安価に固体支持体上の固定化プローブのハイブリダイゼーション効率を向上させることが可能となつた。

※た。また本発明は、臨床診断や生物学的研究に広く用いられているハイブリダイゼーション反応の改良技術として極めて有効であり、これらの核酸検出技術を用いた各種試験やキット類の開発に大きく寄与するものである。

【0041】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 両鎖型

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置: 1..20

特徴を決定した方法: 5

他の特徴: ヒト型結核菌マイコバクテリウム・ツベルクルシス(Mycobacterium tuberculosis) 16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。

配列

ACATGCATCC CGTCGTCTTA

20

【0042】

配列番号: 2

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

(9)

特開2001-269197

15

16

鎖の数：両形鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：5

他の特徴：ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。

配列

TAGGACCAAG GATGTCATGT

20

【0043】

配列番号：3

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：両形鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..18

特徴を決定した方法：5

他の特徴：ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。

配列

CCACACCCG TAAGCCG

18

【0044】

配列番号：4

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：両形鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..18

特徴を決定した方法：5

他の特徴：ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。

配列

TAGGACCAAG GATGTCATGT TCCGCTTAG GGTGTGCG

39

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F 1

7-70-1 (参考)

G 0 1 N 35/02

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(10)

特開2001-269197

Ｆターム(参考) 2G042 AA01 BD12 BE20 CB03 DA08  
FB05 HA07  
2G058 AA09 CC09 EA11 GA01  
4B024 AA01 AA11 CA01 HA12  
4B063 QA01 QA18 Q042 QR32 QR35  
QR55 QR63 QR84 QG03 QG34  
QK02